

含内生菌外植体红掌组培方法的研究

张寅玲¹ 刘艳军² 黄俊轩² 李建科² 杨霞² 杨静慧^{2*} 汪海霞³

(1 天津市药科中等专业学校,300130;2 天津农学院园艺系,天津 300384;3 天津市林业局,300203)

摘要:为了解决组织培养中组织内部带菌的问题,以组织内部带菌的红掌为外植体,采用含有40%的次氯酸钠水溶液消毒10 min,然后分别接种到各种含不同浓度的抗生素的培养基上,经过2~3次继代培养后发现:外植体在含有500 mg/L的羧苄青霉素、100 mg/L硫酸链霉素和1 000 mg/L的制霉菌素的培养基上生长正常,组织内部所带细菌和真菌得到了较好的抑制和消除。

关键词:组织培养;外植体;内生菌;抗生素;红掌

中图分类号:S68 文献标识码:A 文章编号:1008-1488(2006)06-009-03 收稿日期:2006-08-06

Tissue Culture Method of *Anthurium andraeanum* Explants with Entophytic Microorganism

Zhang Yinling¹, Liu Yanjun², Huang Junxuan², Li Jianke², Yang Xia², Yang Jinghui², and Wang Haixia³

(1 Tianjin Medicinal Scientific Technical School, Tianjin 300130 China; 2 Department of Horticulture, Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384 China; 3 Tianjin Forestry Department, Tianjin 300203 China)

Abstract: In order to eliminate microorganism in inner tissue of explants, some experiments were carried on with the entophytic bacteria in explants in tissue culture. Explants of *Anthurium andraeanum* with entophytic microbe were cultured on MS medium containing antibiotic of different concentration after disinfected by 40% NaClO for 10 minutes. After 2~3 generations propagated, explants of *Anthurium andraeanum* grew well and microorganism were controlled and eliminated on the medium containing of Carbencillin 500 mg/L+Streptomycin 100 mg/L+Mycostatin 1 000 mg/L.

Key words: Tissue culture; Explants; Entophytic microorganism; Antibiotic; *Anthurium andraeanum*

在植物组织培养过程中,外植体的消毒处理是组培成功与否的关键步骤。一般情况下,植物组织中很少有微生物存在,若取其作为外植体时,只对它的表面进行常规的消毒处理后,可直接用于组织培养。但在有些植物材料中其组织内往往存在一些微生物,这些微生物有的是植物所感染的各类病害,有的是与植物以共生或寄生的形式存在。对于这些生存于植物组织内部(在植物组织间隙或植物细胞中)的微生物,如果采用常规的消毒处理,往往不能达到外植体消毒的目的,有些微生物暂时没有在组培的初期生长起来,但随着培养时间的加长,植物组织内部的细菌和真菌会越来越多,从而使组培无法继续进行^[1,2]。因此,对组织内部带菌的外植体进行有效的消毒处理,才能使组培顺利进行。有效的消毒处理对无法获得组织内部无菌外植体和珍贵的内部带菌材料的组织培养更有

意义^[3,4]。本研究旨在通过对组织带菌的红掌的不同组织部位取材,进行常规消毒的同时配合几种抑制真菌和细菌生长的抗生素的应用,找到一条对于组织内部带菌的外植体进行有效消毒处理的可行性途径。

1 材料与方法

1.1 植物材料

试验材料为带有细菌病害的巨型红掌的叶片及叶柄为外植体^[5],来源于天津农学院园艺系园林植物实验室。

1.2 主要药品和仪器

超净工作台、光照培养箱、医用高压消毒锅、电子天平、pH计、温度计、移液器、酒精灯、镊子、剪子、三角瓶、烧杯、玻璃棒、培养皿、容量瓶、滤纸、营养钵、恒温振荡器;

杀菌剂(次氯酸钠)、抗生素(羧苄青霉素、硫酸链霉素、制霉菌素);

MS培养基所需的常用化学试剂。

1.3 实验方法

1.3.1 MS培养基的制备

基金项目:天津市自然科学基金项目(023614211, 05YFJMJC14400),天津市科技发展规划项目,天津市农业科技成果转化与推广项目(0504018),教育部留学基金,天津市教育委员会资助项目(20050908)。

作者简介:张寅玲(1974—),女,天津人,讲师,从事制药研究。

*通讯作者。

MS 培养基+BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L, 并附加蔗糖 30 g、琼脂粉 6.5 g、肌醇 0.1 g。调 pH 为 6.2, 然后分装在 500 mL 广口三角瓶中, 高温灭菌 20 min。断开电源降压至 0.1 Mpa 以下时放气, 降压至 0 Mpa 待至冷却后打开, 取出冷却备用。

1.3.2 试材的准备

取带有细菌病害的巨型红掌的叶片及叶柄, 用剪刀剪成小段或小片。70%的酒精消毒 30 s, 再用含有有效氯 2.8%的次氯酸钠水溶液消毒 15 min, 无菌水冲洗 3~5 次, 去掉外植体边缘因消毒变色的部分, 切成 2 cm 大小的小块待用。

1.3.3 抗生素的准备

分别称取硫酸链霉素、羧苄青霉素、制霉菌素, 用去离子水配成 100 mg/L、500 mg/L、1 000 mg/L 的母液, 用 0.2 μ m 的微孔过滤器进行抽滤灭菌后备用。

1.3.4 含有不同种类、不同浓度抗生素培养基的配制

将凝固备用的培养基放入微波炉中加热融化, 待其温度降至 50 $^{\circ}$ C 时(没有再次凝固前)在超净台中加入所需抗生素。

只加羧苄青霉素的设 3 个梯度, 使其在培养基中的终浓度分别为 250 mg/L、500 mg/L、1 000 mg/L; 加硫酸链霉素的为 50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L; 加羧苄青霉素与硫酸链霉素 2 种的为 3 个梯度, 分别为 250+50 mg/L、500+100 mg/L、1 000+200 mg/L; 加入羧苄青霉素、硫酸链霉素、制霉菌素 3 种抗生素的 3 个梯度, 分别为 250+50+500 mg/L、500+100+1 000 mg/L、1 000+200+2 000 mg/L。

将上述加好抗生素的培养基分装到 100 mL 广口三角瓶中, 每瓶加入 25 mL, 待培养基凝固冷却后进行接种外植体。

1.3.5 外植体接种及培养

将消毒后切成小块的红掌外植体分别接种在含不同种类及浓度的抗生素培养基上, 每个三角瓶中接种 8~10 块, 其中每块外植体的边缘(伤口部位)都要与培养基相接触。培养条件为 28 $^{\circ}$ C, 24 h 光照, 光强 2 000 lx, 培养 1 周后观察记录生长状况, 同时进行继代培养。

2 结果与分析

2.1 不同浓度羧苄青霉素对外植体消毒效果的影响

表 1 可以看出, 加入羧苄青霉素抑制细菌效果不明显, 而羧苄青霉素的浓度超过 500 mg/L 时, 其对外植体的生长开始造成了不良的影响, 因此再靠增加羧苄青霉素的浓度来提高其抑制细菌的效果是不可行

表 1 羧苄青霉素对红掌外植体的消毒效果

羧苄青霉素 /(mg/L)	接种数 /块	真菌污染数 /块	细菌污染数 /块	污染率 /%	生长表现
250	20	0	16	80.0	A
500	20	0	18	90.0	A
1 000	19	0	18	94.7	B
CK	27	0	27	100.0	A

注: A. 外植体生长正常, 颜色绿色; B. 生长受抑, 无生长量, 颜色变黄; C. 生长完全停止, 颜色变黑, 并逐渐死亡。(表 2、3、4 同此)

的; 另外, 从对照来看, 对外植体造成污染的主要是细菌, 而没有发现真菌出现, 因此羧苄青霉素对真菌的抑制作用在此实验中没能反映出来。

表 2 硫酸链霉素对红掌外植体的消毒效果

硫酸链霉素 /(mg/L)	接种数 /块	真菌污染数 /块	细菌污染数 /块	污染率 /%	生长表现
50	47	2	0	4.2	A
100	30	2	0	6.7	A
200	33	0	2	6.0	B
CK	27	0	27	100.0	A

2.2 不同浓度硫酸链霉素对外植体消毒效果的影响

从表 2 可以看出, 加入硫酸链霉素的抑制细菌的效果非常明显, 即使在低浓度(50 mg/L)时抑制细菌的效果也能达到 100%; 从对照来看, 对外植体造成污染的主要是细菌, 没有发现真菌出现。在 50 mg/L、100 mg/L 硫酸链霉素处理中个别有真菌出现, 而对照没有出现真菌, 分析主要原因可能是在无菌操作中污染所致。

2.3 不同浓度羧苄青霉素与硫酸链霉素对外植体消毒的影响

从表 3 可以看出, 加入羧苄青霉素与硫酸链霉素 2 种抗生素的抑制细菌效果非常明显, 在低浓度(250+50 mg/L)时抑制细菌的效果也很好, 但对真菌的抑制作用几乎看不到, 即使其浓度增至 1 000+200 mg/L 时(此时的浓度对外植体的生长开始造成影响)仍不起作用, 这说明羧苄青霉素与硫酸链霉素 2 种抗生素对真菌造成的外植体的污染没有抑制作用。

2.4 羧苄青霉素、硫酸链霉素和制霉菌素对外植体消毒效果的影响

表 3 羧苄青霉素与硫酸链霉素对红掌外植体的消毒效果

羧苄青霉素+ 硫酸链霉素 /(mg/L)	接种数 /块	真菌污染数 /块	细菌污染数 /块	污染率 /%	生长表现
250+50	45	40	2	93.3	A
500+100	61	54	0	88.5	A
1 000+200	45	38	0	84.4	B
CK	27	26	27	100.0	A

表4 羧苄青霉素、硫酸链霉素和制霉菌素对红掌外植体的消毒效果

羧苄青霉素+硫酸链霉素+制霉菌素/(mg/L)	接种数/块	真菌污染数/块	细菌污染数/块	污染率/%	生长表现
250+50+500	20	7	11	90.0	A
500+100+1 000	20	2	0	10.0	B
1 000+200+2 000	19	0	3	4.5	C
CK	27	13	27	100.0	A

从表4可以看出,加入羧苄青霉素、硫酸链霉素和制霉菌素3种抗生素对外植体消毒处理效果非常明显,不但对细菌起到很好的抑制作用(500+100+1 000 mg/L时达到100%),同也能基本控制真菌的生长,在不影响外植体正常生长的情况下,在培养基中附加这3种抗生素对外植体消毒处理效果可以达到组织培养的要求。

3 讨论

3.1 采用抗生素对外植体消毒处理可以有效地控制内生菌的生长

从以上几组抗生素的抑菌实验中可以看出,采用抗生素对外植体消毒处理的效果是明显的,随着抗生素浓度的增大,对菌的抑制作用越强,但对外植体生长的抑制作用也越强,因此,应选择一个合适的抗生素浓度,既能抑制菌的生长,又不对外植体造成伤害。本次试验由于取材的随机性,导致在真菌污染方面有差异,单一抗生素处理和对照的材料均无真菌污染,而几种抗生素同时使用处理和对照的材料有真菌污染。

3.2 不同抗生素对菌的抑制作用不同

由于不同菌对不同抗生素的抗性不同,在采用抗生素对外植体消毒处理时,应有针对性地选择抗生素的种类,避免使用一些易使内生菌产生抗药性的抗生素种类。目前市场上常用的一些抗生素一般效果都十分显著,在生产上为降低成本,也可采用价格较低的医用或兽用抗生素^[6]。另外从实验中还可以看出同时采用多种抗生素对外植体消毒处理的效果是最好的,尤其是对真菌的抑制,一些常用抗生素的效果不明显,而对真菌有广谱抗性的制霉菌素的效果十分突出,因此在实际操作中应尽可能采用制霉菌素与其它抗生素联合使用以达到最好的抑菌效果。

3.3 外植体在培养基上的继代时间影响抗生素对菌的抑制

在实际的抑菌实验中,当外植体周围出现明显的菌落时抗生素对菌的抑制作用将失去,这时菌很快生长起来。这说明抗生素对少量菌有抑制作用,当菌的生长速度及数量达到一定程度时,抗生素就会失去抗菌作用,因此,在外植体接种前的消毒工作十分重要,如果外植体上带有大量的菌类,即使采用抗生素来抑制,也很容易造成污染。

随着培养时间的增长,抗生素的效率逐渐下降。实验中发现,在1周后外植体仍然留在原培养基上,这时就有个别的外植体出现污染的现象,因此在实验中外植体应在培养一段时间后进行继代,以保证抗生素的有效性。

随着培养时间的延长,大约20 d后去掉抗生素,此时的外植体再进行下一步实验则其上的内生菌就不会长起来,这也说明内生菌的数量随着培养时间的延长,在抗生素的作用下会逐渐减少和消失。

4 结论

在组织培养中,对于组织带菌的外植体消毒处理时附加抗生素抑菌培养,会使消毒的效果提高;要根据外植体中所带菌的种类选用适当的抗生素,同时要及时继代,以保证抗生素的有效浓度。采用消毒剂表面消毒并配合抗生素抑菌法的应用不但对组织带菌外植体消毒处理有很好的作用,同时对一些幼嫩的植物组织的消毒也有借鉴性,如采用低浓度的消毒液处理外植体,同时配合抗生素的应用,会大大改善其消毒效果。

参考文献

- [1] 杜雪玲,张振霞,余如刚,等.植物组织培养中的污染成因及其预防[J].草业科学,2005,22(1):24-27.
- [2] 赵佐敏,艾勇.植物组织培养过程中的污染原因及控制措施[J].贵州农业科学,2004,32(1):61-62.
- [3] 吕校石,杨建民,刘云强,等.椴树组织培养中污染控制技术初步研究[J].河北林果研究,2004,19(1):1-5.
- [4] 黄萍,颜谦,童安毕,等.马铃薯茎尖培养及快速繁殖抗污染的效果研究[J].贵州农业科学,2003,31(3):44-45.
- [5] 蒋桂芝.红掌栽培细菌性病害及其防治方法.农业与技术[J].2004,24(6)116-117.
- [6] 王亦菲,陆瑞菊,周润梅,等.彩色海芋组织培养过程中内生菌的抑制[J].上海农业学报,2001,17(2):82-83.

更正

本刊2006年第5期第9页左栏倒数第7、第6行的“2005年12月至2006年12月”有误,更正为“2004年12月至2005年12月”,并向读者致歉!

《西南园艺》编辑部